



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Máster

Nanopartículas de oro como vector de terapia génica
en el tratamiento de la Esclerosis Lateral Amiotrófica

Gold nanoparticles as a gene therapy vector in the
treatment of Amyotrophic Lateral Sclerosis

Autor

Laura Celorrio Aranda

Director

Raquel Manzano Martínez

Ponente

Manuel Arruebo Gordo

Nanopartículas de oro como vector de terapia génica en el tratamiento de la Esclerosis Lateral Amiotrófica

RESUMEN

El descubrimiento de mutaciones de la enzima superóxido-dismutasa 1 (SOD1) en pacientes con Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) como causa de la enfermedad ha abierto la puerta a nuevas investigaciones con el objetivo de encontrar un tratamiento eficiente. El principal problema se encuentra en el direccionamiento de las terapias a las motoneuronas, afectadas en la ELA, por lo que se buscan vectores biocompatibles que cumplan cuatro objetivos: una carga eficiente del fármaco, atravesar la barrera hematoencefálica, la internalización celular y la liberación del fármaco. En el presente trabajo se propone caracterizar los efectos de nanopartículas de oro en la viabilidad y ciclo celular de las neuronas motoras, para posteriormente ser utilizadas como transporte de RNA de interferencia (siRNA). El objetivo que se busca es una reducción en la expresión de la proteína mutada por degradación del RNA mensajero (mRNA) que la codifica en una línea celular de motoneuronas NSC-34. Los resultados muestran una unión muy eficiente de siRNA con las nanopartículas Au-PEI-PEG para todas las concentraciones evaluadas. Respecto a la viabilidad celular, se obtiene un incremento de la dosis subcitotóxica del 300 % tras la conjugación con el siRNA y una buena internalización a partir de las 24 horas de tratamiento. Sin embargo se precisa indagar más en los mecanismos moleculares que desencadenan los cambios observados en el ciclo celular y granularidad tras el tratamiento. Finalmente, se ha concluido que las nanopartículas de oro presentan un alto potencial como vector de moléculas en terapia génica para tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

Gold nanoparticles as a gene therapy vector in the treatment of Amyotrophic Lateral Sclerosis

ABSTRACT

The discovery of mutations in the enzyme superoxide dismutase 1 (SOD1) in patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) as the cause of the disease has opened the door to new research with the aim of finding an efficient treatment. The main problem lies in the targeting of therapies to motor neurons, affected in ALS, so biocompatible vectors are searched for achieve four objectives: efficient drug loading, blood-brain barrier crossing, cell internalization and drug release. In the present work, it is proposed to characterize the effects of gold nanoparticles, the viability and cell cycle of motor neurons to be used as an small interference RNA (siRNA) transport. The objective sought is a reduction in the expression of the mutated protein by degradation of the messenger RNA that encodes it in a cell line of motor neurons NSC-34. The results show a very efficient siRNA binding with the Au-PEI-PEG nanoparticles for all tested concentrations. Regarding cell viability, an increase in the subcitotoxic dose of 300 % was obtained after conjugation with the siRNA and a good internalization after 24 hours of treatment. However, it is necessary to investigate more in the molecular mechanisms that trigger the changes observed in the cell cycle and granularity after treatment. Finally, it has been concluded that gold nanoparticles have a high potential as a vector of molecules in gene therapy for the treatment of neurodegenerative diseases.

Índice

1. Introducción	1
1.1. Esclerosis lateral amiotrófica	1
1.1.1. Causas	2
1.1.2. Tratamientos	2
1.2. Nanopartículas de oro	6
1.2.1. Toxicidad y biocompatibilidad de las nanopartículas de oro . . .	6
1.2.2. Aplicaciones terapéuticas	7
2. Motivación y objetivos	9
3. Fundamentación teórica	11
4. Metodología y resultados	13
4.1. Síntesis y caracterización de las nanopartículas	13
4.2. Conjugación de nanopartículas con siRNA	15
4.3. Efecto de las nanopartículas sobre la línea celular de motoneurona . . .	16
4.3.1. Citotoxicidad	16
4.3.2. Regulación de la complejidad celular tras tratamiento con Au-PEI-PEG-siRNA NPs	19
4.3.3. Regulación del ciclo celular en las motoneuronas tras tratamiento con Au-PEI-PEG-siRNA NPs	20
4.3.4. Visualización de la internalización de las Au-PEI-PEG-siRNA mediante microscopía confocal	25
5. Conclusiones	27
6. Futuras líneas de investigación	29
7. Bibliografía	31
Lista de Figuras	35

Anexos	37
A. Protocolos de síntesis de nanopartículas	39
A.1. Nanopartículas Au-PEI	39
A.2. Recubrimiento con PEG	40
B. Protocolo de funcionalización de nanopartículas con siRNA	41
C. Protocolo de PCR cuantitativa	43
D. Protocolos de permeabilización y tinción para microscopía confocal	45

Capítulo 1

Introducción

1.1. Esclerosis lateral amiotrófica

Con el aumento de la esperanza de vida, se observa un incremento en el padecimiento de las enfermedades neurológicas, llegando a representar el 19 % de los fallecimientos en España [1]. Entre estas enfermedades se encuentran las enfermedades neurodegenerativas progresivas como el Alzheimer, el Parkinson, o la Esclerosis Lateral Amiotrófica, esta última con una esperanza de vida de 2 a 5 años desde su diagnóstico y una incidencia de 2.08 personas de cada 100.000 en Europa [2]. A pesar del impacto que tienen estas enfermedades, a día de hoy no se ha encontrado un tratamiento eficiente y solo se aplican tratamientos sintomáticos. Sin embargo, son muchas las investigaciones que se centran en descubrir las causas de la enfermedad y en desarrollar nuevos fármacos con el objetivo de encontrar una cura.

La Esclerosis Lateral Amiotrófica es una enfermedad neurodegenerativa progresiva que afecta a las motoneuronas del cerebro y de la médula espinal. La degeneración y muerte de estas células impide que las fibras musculares reciban los impulsos del cerebro causando atrofia muscular, parálisis, y finalmente, la muerte. Se denomina esclerosis lateral debido al endurecimiento que se produce en la región lateral de la médula espinal, donde se localizan las células nerviosas que se encargan de la señalización y control de los músculos [3]. La ELA se clasifica en dos tipos, esporádica y hereditaria o familiar. La ELA familiar (ELAf) representa un 10 % de todos los casos y numerosas investigaciones se centran en el estudio del mal plegamiento de la proteína antioxidante superóxido dismutasa-1 por mutaciones genéticas como causa de esta rama de la enfermedad [4][5]. Sin embargo, estudios revelan que esta enzima también está mutada en un 5 % de afectados con ELA esporádica (ELAe) que presentan sintomatología y patología coincidentes entre los dos tipos de la enfermedad [6] [7].

1.1.1. Causas

La causa del padecimiento de la ELA es todavía desconocida para la mayoría de los casos. Sin embargo, algunas de las causas que se investigan son los factores ambientales (el tabaco, el desequilibrio químico producido por la exposición a metales o la radiación electromagnética), la dieta alta en grasas y glutamato, la herencia genética y el mal plegamiento de proteínas [8]. Una de las hipótesis más aceptadas es el mal plegamiento de la enzima SOD1 como causa de la ELA. Esta enzima se encarga de la catálisis de superóxidos a oxígeno y peróxido de hidrógeno y se encuentra mutada en el 20 % de las personas con ELA familiar y en el 5 % de las personas con ELA esporádico [8]. El mal plegamiento de la proteína en la ELAf es debido a una mutación en los genes que la codifican produciendo una inestabilidad estructural que causa el mal plegamiento de la enzima y consecuentemente, la formación de agregados. Sin embargo, hay evidencia de que la forma *wild-type* SOD1 bajo estrés celular esta implicada en la ELAe [9] [10]. Esta SOD1 mutante y agregada no pierde su función antioxidante sino que genera una función tóxica celular que conduce a la pérdida de motoneuronas en la médula espinal evidenciada en modelos de animales transgénicos [11] [12].

Por otra parte, estas proteínas mal dobladas no solo actúan como agentes infecciosos en la célula huésped sino que puede ser secretados al medio extracelular y captados por células adyacentes, originando a su vez al mal plegamiento de la SOD1 endógena, es lo que se conoce como mecanismo priónico, o *prion-like*. La figura 1.1 recoge el esquema de dos mecanismos propuestos para la captación de agregados. Estos pueden ser liberados de las células cuando mueren siendo captadas por macropinocitosis por otras células, pero también pueden ser excretados al espacio celular como exosomas y ser captados por células vecinas por endocitosis [13] [14] (Figura 1.1).

Por tanto, los agregados de SOD1 en las motoneuronas contribuyen a la muerte celular dando lugar a la degeneración observada en pacientes con ELA [15]. Sin embargo, aunque hay algunas hipótesis, el mecanismo de acción de estos agregados no es del todo conocido y dificulta el hallazgo de nuevos tratamientos más eficientes.

1.1.2. Tratamientos

La ELA carece de fármacos que detengan o reviertan la pérdida de neuronas en la actualidad y los tratamientos se enfocan en la atención temprana, la prevención del deterioro prematuro y un mejor afrontamiento del proceso de dependencia [16]. Al ser una enfermedad progresiva e incurable, especialistas multidisciplinares combinan tratamientos sintomáticos y paliativos con apoyo psicológico y rehabilitación.

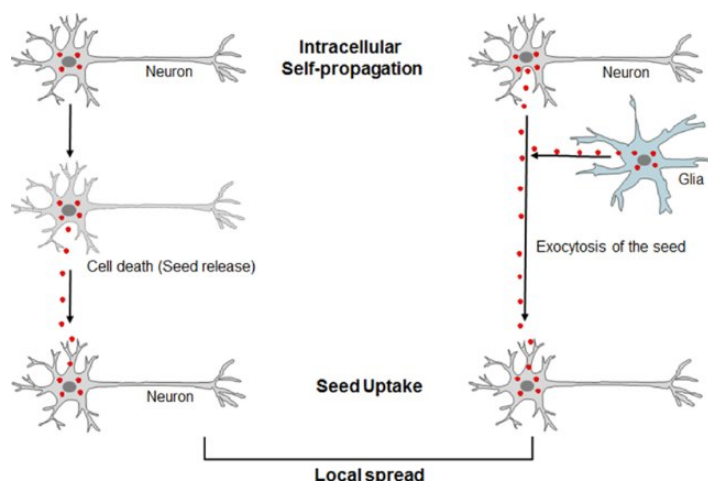


Figura 1.1: Mecanismos de transmisión propuesto de los agregados tóxicos en motoneuronas que contribuyen a la patogénesis de la enfermedad [14]

El Riluzol es el único tratamiento farmacológico aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration*) que tiene un uso beneficioso en la supervivencia de los pacientes con ELA. Este fármaco atrasa la necesidad de la traqueotomía o la dependencia de ventilación-asistida en los pacientes y puede incrementar la supervivencia de dos a tres meses con una dosis segura [17]. Sin embargo, los efectos beneficiosos son muy modestos y el medicamento es caro. Algunos de los tratamientos sintomáticos que se utilizan en la clínica se pueden encontrar en la figura 1.2 [16]. A pesar de la investigación y de los ensayos clínicos de más de 18 fármacos en los últimos años, no se ha identificado ningún otro tratamiento aparte del Riluzol que pueda aumentar la esperanza de vida de los pacientes con ELA [18]. Estos fracasos se deben a que no se conoce todavía con exactitud el mecanismo de la enfermedad y que la esperanza de vida de los pacientes es corta.

Debido al reciente descubrimiento de la relevancia de los agregados tóxicos de SOD1 mutada en la enfermedad, las últimas investigaciones se centran en la búsqueda de terapias con moléculas biológicas que neutralicen estos agregados o eviten la transcripción de la SOD1 mutada. Sin embargo, todavía hay que hacer frente a diversos retos como el paso de la barrera hematoencefálica, la internalización y la liberación de las biomoléculas en las células diana.

En este sentido, la inmunización activa mediante infusión de proteína SOD1 mutada recombinante a modo de vacunación ha demostrado que estimula el sistema inmune favoreciendo el desarrollo de anticuerpos que neutralizan la toxicidad de la SOD1 mutada en ratones modelo de ELA. Esto genera un retraso en la aparición de la enfermedad y un aumento en la supervivencia [19]. Sin embargo existen riesgos

Symptoms	Treatment
Disability and weakness	Orthotics (ankle foot orthosis, neck collars) Physiotherapy Adaptive aids (walking frame, wheelchair)
Dysphagia	Assessment by speech therapist and dietitian Safe swallowing techniques and modified diet Insertion of gastrostomy tube dyspnea and poor cough Ventilator support Morphine or benzodiazepines Chest physiotherapy Suction machine Manually assisted coughing techniques
Pain (i.e., musculoskeletal pain and cramps, fasciculations and spasticity, skin pressure pain caused by immobility)	Physiotherapy, NSAIDs Muscle relaxants (baclofen, botulinum toxin) Anticonvulsants (gabapentin) Re-positioning and pressure area care Opioid drugs Pressure-relieving cushions and mattress
Dysarthria	Assessment by speech pathologist Communication aids Educate family and caregivers Cognitive changes (frontal lobe dysfunction or dementia) Explain symptomatology to caregivers and family Antidepressant therapies
Sialorrhea	Anticholinergic antidepressants (amitriptyline) Anticholinergic drugs (glycopyrronium bromide) Botulin toxin injections Radiation of salivary glands Mouth care products Suction
Thickened saliva	Natural remedies (papaya) Ensure adequate hydration Saline nebulisers; nebulised N-acetylcysteine Suctioning of the mouth Mouth care
Emotional lability	Educate patients with ALS and caregivers Amitriptyline Benzodiazepines Dextromethorphan hydrobromide/quinidine sulfate
Depression and anxiety	Counseling Benzodiazepines Antidepressants
Sleep disturbance	Treat underlying problem Respiratory review, noninvasive ventilation Benzodiazepines, tricyclic antidepressants
Constipation	Dietary changes (increase fluid and fiber intake) Use formulations high in bran, bulk, or fiber Regular oral aperients (Movicol or suppositories)

ALS: Amyotrophic lateral sclerosis, NSAIDs: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs

Figura 1.2: Tratamientos sintomáticos para la ELA según sintomatología [16]

en esta terapia como la reacción no controlada del sistema inmune y la toxicidad impredecible de la proteína recombinante introducida. Ante estos riesgos, se han desarrollado terapias de inmunización pasiva a partir de la administración por vía intracerebroventricular de anticuerpos monoclonales en ratones G93A-SOD1 [20]. Estos anticuerpos monoclonales son capaces de reconocer solo la proteína SOD1 mal plegada y reducir la toxicidad celular de los agregados hasta un 23% en la médula espinal, prolongando la vida de los ratones 9 días. A pesar de los resultados, los anticuerpos tienen una penetración pobre en el sistema nervioso central cuando se administran en la periferia.

Otra estrategia de interés es la reducción de la expresión de la proteína a partir de RNA de interferencia. Los small interference RNA o RNA de interferencia son pequeños RNA (20-25 nucleótidos) complementarios a la secuencia del gen diana de interés que promueven la degradación de su RNA mensajero, y por tanto, evitan la síntesis de la proteína. Sin embargo, esta terapia tiene un doble obstáculo para ser aplicada en enfermedades neurodegenerativas como la ELA, el siRNA no solo ha de ser capaz de ser internalizado por la célula diana sino que además debe atravesar la barrera hematoencefálica que protege el sistema nervioso central del acceso de moléculas desde la circulación periférica, por lo que debe ser inyectado directamente en el sistema nervioso central o encapsulado en un vector capaz de cruzar esta barrera. En este sentido, se llevaron a cabo estudios clínicos de fase 1 introduciendo el siRNA directamente en el sistema nervioso central a través de la médula espinal que muestran la tolerancia al fármaco, sin embargo se concluye con que es necesaria una mayor dosis de tratamiento y mayor número de pacientes para poder establecer resultados positivos [21]. Por otra parte, estudios con ratones han demostrado que es posible el transporte del SOD1-siRNA encapsulado en un tipo de virus adenoasociado (AAV-2) a la médula espinal mediante inyecciones intramusculares [22]. Sin embargo, aunque este sistema ha demostrado ser eficaz en la preservación de la fuerza muscular en el ratón modelo de ELA plantea dudas por la inmunogenicidad y potencial toxicidad del vector viral. Estos antecedentes plantean la necesidad de desarrollar nuevos vectores para transportar las moléculas terapéuticas, bien anticuerpos, bien siRNAs a las motoneuronas, como tratamiento para la ELA.

1.2. Nanopartículas de oro

Las nanopartículas (NPs) son partículas que poseen tamaños entre 1 y 100 nm. Este tamaño les da una propiedades físicas y químicas diferentes a las que posee el mismo material a escala macroscópica. Su elevada relación superficie-volumen y su tamaño semejante a moléculas biológicas les confiere un alto potencial para aplicaciones biomédicas.

El uso de nanopartículas de oro (AuNPs) está muy extendido en investigaciones científicas debido a su diversidad de aplicaciones por sus propiedades fototérmicas, su variedad de tamaños y formas y su fácil síntesis [23]. Además, son partículas biocompatibles a las dosis usadas y presentan baja toxicidad al tratarse de un material químicamente estable. Una nanopartícula de oro puede ser utilizada como vector gracias a su elevada área superficial de carga por unidad de volumen y su afinidad para crear enlaces covalentes y electrostáticos con otras moléculas. La figura 1.3 muestra como se puede funcionalizar y bioconjuguar con diferentes moléculas, tanto terapéuticas como de direccionamiento o incluso, moléculas cuyo objetivo es reducir la toxicidad celular de las nanopartículas en ensayos *in vitro*. Por tanto, las AuNPs presentan un extraordinario potencial como agentes fototerapéuticos con hipertermia óptica en el tratamiento del cáncer, así como para la elaboración de nanoestructuras como transporte para la administración de fármacos dirigida y también en biosensado.

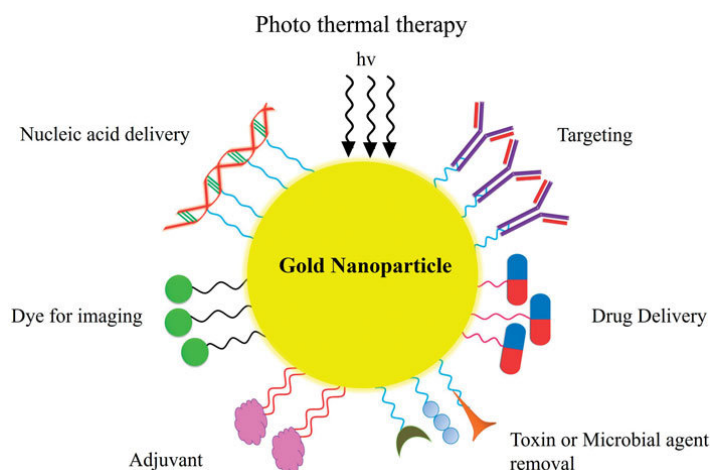


Figura 1.3: Diferentes aplicaciones de las nanopartículas de oro [24]

1.2.1. Toxicidad y biocompatibilidad de las nanopartículas de oro

A pesar de que el oro coloidal es un material inerte y estable, existen discrepancias en las investigaciones sobre su biodistribución y toxicidad en el citoplasma celular.

Se ha observado que las dosis subcitotóxicas de las AuNPs varían dependiendo de la forma y tamaño así como de los distintos agentes empleados para su estabilización y funcionalización superficial. Tamaños de 1-2 nm presentan una toxicidad potencialmente alta debido a una unión irreversible a biopolímeros que causan apoptosis celular mientras que tamaños de 15 nm permiten elevar la concentración viable entre 60 y 100 veces [25] [26]. Se ha demostrado que las características superficiales de las AuNPs influyen en su toxicidad. Las nanoestructuras catiónicas presentan mayor toxicidad que las aniónicas debido a que reaccionan con la membrana de las células al tener ésta carga negativa. El recubrimiento con moléculas como el polietilenglicol (PEG) modifica la carga positiva superficial de las AuNPs neutralizándola y confiriéndoles menor toxicidad. Además, favorece el tiempo de circulación en el plasma antes de ser detectadas por el sistema inmune. La biodistribución de las AuNPs esta relacionada con el método de administración, el tamaño y la dosis. No obstante, nanopartículas de 15 nm han sido encontradas en tejido de cerebro de ratón tras 24 horas de la administración intravenosa. Esto evidencia que pequeñas AuNPs son capaces de penetrar la barrera hematoencefálica [27]. Se cree que se puede deber a la brecha de 20 nm de separación entre los astrocitos y el endotelio capilar.

1.2.2. Aplicaciones terapéuticas

Una de la aplicaciones más extendidas de las AuNPs es el transporte de fármacos y moléculas terapéuticas. Estas nanoestructuras son capaces de transportar varios fármacos y moléculas como proteínas, plásmidos, siRNAs y agentes quimioterapéuticos por su afinidad de enlace con grupos tiol, amina y disulfuros. Las ventajas que tienen las AuNPs es que pueden ser un sistema de liberación inteligente, que responda ante un estímulo interno o externo. Un ejemplo de estímulo de activación sería el cambio del pH al entrar en un tejido diana. Otra forma de liberación interesante viene dada por su propiedad fototérmica, de esta forma con un estímulo lumínico se puede activar desde el exterior la liberación de un fármaco según el requerimiento metabólico. Una aplicación que aprovecha esta propiedad es el tratamiento mediante hipertermia óptica. Un haz de luz irradia las nanopartículas que se comienzan a calentar y dañan las células o tejidos malignos donde han sido inyectadas. Otras aplicaciones de interés son imagen por rayos x y sensores químicos y biológicos [28].

La aplicación más novedosa es en terapia génica como transportador de material genético (plásmidos, siRNAs etc). El problema que presentan los ácidos nucleicos es que tienden a degradarse por las endonucleasas presentes en el medio y que en estado

libre no son internalizadas por las células. Se busca un vehículo que aporte protección frente a la degradación, que favorezca la internalización en las células diana y que pueda liberar el material genético en el núcleo celular [29]. Como hemos mencionado anteriormente, como alternativa se ha utilizado virus, los cuales pese a su elevada eficiencia presentan problema de citotoxicidad e inmunogenicidad. Otras alternativas han sido el uso de liposomas o dendrímeros con una eficacia menor debido a la barreras a que se enfrentan entre el lugar de administración y su localización en el núcleo de la célula [30] [23].

Capítulo 2

Motivación y objetivos

La Esclerosis Lateral Amiotrófica es una enfermedad rara que cursa con degeneración de las motoneuronas con una progresión rápida y una incidencia de 2,08 personas de cada 100.000 al año en Europa [2]. A pesar de las investigaciones que se están llevando a cabo, no se ha encontrado todavía un método de diagnóstico y tratamiento efectivo. La motivación de este trabajo es el estudio y la aplicación de una técnica innovadora que incorpora la ingeniería y la nanotecnología con el objetivo de encontrar un tratamiento efectivo para esta enfermedad neurodegenerativa.

El objetivo principal es la síntesis y funcionalización de nanopartículas como vector para terapia en ELA y la aplicación de la técnica en modelos *in vitro*. Se proponen nanopartículas de oro recubiertas con PEI y PEG (Au-PEI-PEG) funcionalizadas con ARN de interferencia específico de la SOD1 (siRNA-SOD1), induciendo la degradación del mRNA de la SOD1 y por lo tanto reduciendo la traducción a la proteína. Para valorar la eficiencia de la técnica se evaluará en líneas celulares neuronales y se llevará a cabo un estudio completo de la influencia de las nanopartículas en este tipo de células.

Además del objetivo principal, también se establecen como objetivos personales: el aprendizaje y desarrollo en el campo de la nanotecnología, el manejo de la instrumentación en un laboratorio de investigación, la optimización del proceso de síntesis y funcionalización y finalmente, el estudio y la aplicación de la técnica en el campo de la biología y la medicina.

Capítulo 3

Fundamentación teórica

Se van a sintetizar nanopartículas de oro esféricas y macizas como vector de transporte de siRNA. Se estima un tamaño óptimo de unos 10 nm para que sean potencialmente capaces de cruzar la barrera hematoencefálica y mantener una alta relación superficie-volumen. Por otra parte, se quiere mantener el mayor tamaño posible para evitar una disminución en la dosis viable producida por la toxicidad que presentan las nanopartículas inferiores a los 3 nm. Para la síntesis se lleva a cabo el método reducción-oxidación por su simplicidad y porque es un método que no involucra reactivos que puedan dañar a las motoneuronas. Las nanopartículas serán sintetizadas con polietilenimina (PEI), que actúa como agente reductor y además aumenta la hidrofobicidad de la nanopartícula aumentando la internalización celular y la eficacia de la transfección en terapias génicas ya que el PEI al entrar al endosoma celular se protona y rompe dicho exosoma liberando su contenido al citosol [31]. Además, serán recubiertas con PEG para cumplir tres objetivos principales; neutralizar la carga superficial de las Au-PEI para disminuir la toxicidad, incrementar el tiempo de residencia en el organismo y potenciar la unión en la bioconjugación.

Para la conjugación con biomoléculas se van a seguir la estrategia de funcionalización con siRNA-SOD1 (representada en la figura 3.1) como terapia génica para la ELA. Este fragmento de ARN tiene una longitud de 22 pares de bases y es una secuencia del mRNA que codifica la proteína SOD1, por tanto al reconocer la secuencia complementaria en el mRNA del gen SOD1 se une a él formando una RNA de doble cadena que es reconocido por un complejo denominado RISC (*RNA-induced silencing complex*), que degradará esta hebra y actuará como inhibidor de la expresión de este gen. La degradación del mRNA impide, por lo tanto, que se sintetice la proteína SOD1 y la formación de los agregados tóxicos. Se han observado algunos efectos secundarios derivados del silenciamiento de la proteína SOD1, con función antioxidante en modelos de ratón sanos [32]. Sin embargo, en ratones transgénicos que portan la mutación de

este gen, la reducción de la expresión de la SOD1 retrasa la aparición de síntomas en más de un 100 % y extienden la supervivencia un 80 % [33].

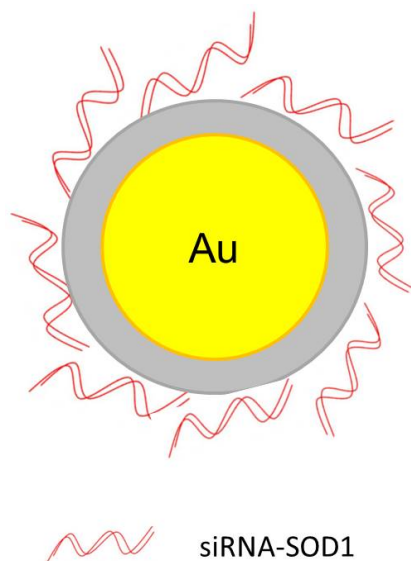


Figura 3.1: Esquema de las nanopartículas Au-PEI-PEG-siRNA-SOD1. El núcleo es de oro y está recubierto por una capa de PEG. En la superficie se conjugan electrostáticamente siRNA-SOD1

A pesar de las numerosas investigaciones de las nanopartículas en terapias de cáncer, no se han llevado a cabo investigaciones de nanopartículas de oro en motoneuronas. Por lo tanto, se precisa de un estudio completo del efecto de estas partículas en el interior de estas células. Se estudiará la toxicidad y cómo pueden afectar a las distintas fases del ciclo celular. Para saber si se han cumplido los objetivos de internalización y liberación de la molécula terapéutica también se llevarán a cabo pruebas de microscopia confocal.

Capítulo 4

Metodología y resultados

4.1. Síntesis y caracterización de las nanopartículas

Para la síntesis de nanopartículas de oro recubiertas con polietilenimina (Au-PEI) se prepara una disolución de ácido cloroáurico HAuCl_4 (520918, Sigma-Aldrich) de pureza 99 % a una concentración de 50 mg/ml y una disolución de PEI (408727, Sigma-Aldrich) 25 kDa a 0,5 nM. Se mezclan 19 ml de la disolución de HAuCl_4 con 1 ml de la disolución de PEI. Se calienta la mezcla hasta llegar a ebullición y se deja 15 minutos observando el cambio de color a un tono rosa (Figura 4.1) (Anexo A.1). Puesto que las nanopartículas sintetizadas son muy pequeñas (en torno a los 9 nm) no es posible el lavado por centrifugación por lo que se dializa con filtros de 55 kDa durante 48 horas con el objetivo de eliminar los restos de PEI que no han reaccionado. Una vez finalizado el periodo de la diálisis se procede a concentrarlas con el rotavapor y a medir la concentración por diferencia de pesada. Esta medida se realiza por triplicado en pocillos desechables, debido a la capacidad de rehidratación de estas partículas.

Las nanopartículas Au-PEI son recubiertas con polietilenglicol. Para el recubrimiento con PEG se utiliza uno comercial, α -Mercapto- ω -carboxy-PEG (712515, Sigma-Aldrich), en relación peso/peso 1:1. El PEG se añade gota a gota a una disolución de nanopartículas de concentración 2 mg/ml bajo agitación y se deja reaccionar durante 4h a temperatura ambiente. Para quitar el exceso de PEG que no ha reaccionado se dializa en filtros de 14 kDa durante 48 horas (Anexo A.2). El



Figura 4.1: Nanopartículas Au-PEI tras diálisis.

tamaño de las nanopartículas es caracterizado mediante Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM) y mediante el *Dynamic Light Scattering* (DLS) o espectroscopía de correlación de fotones. Los resultados del TEM muestran nanopartículas esféricas muy regulares en forma y tamaño con unos valores de diámetro mínimo de Feret de $9,3 \pm 1,8$ nm para las Au-PEI y de $13,5 \pm 1$ nm para las Au-PEI-PEG (Figura 4.2).

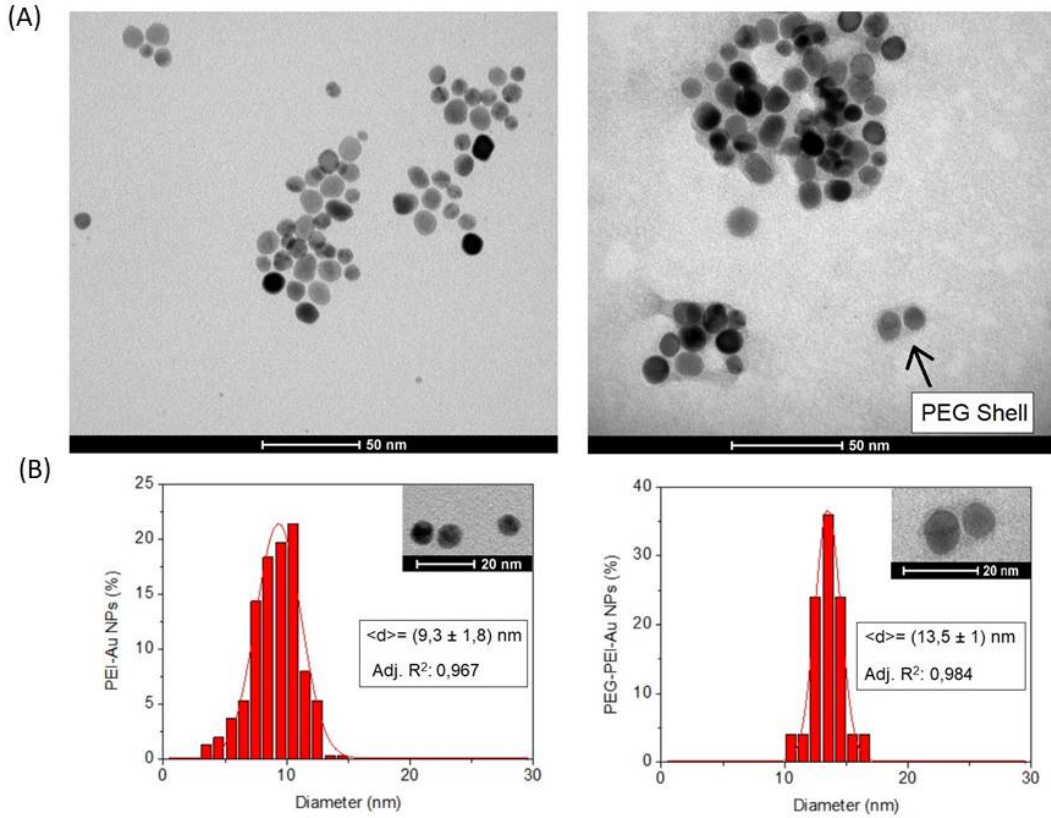


Figura 4.2: Caracterización del tamaño de las nanopartículas Au-PEI y Au-PEI-PEG. (A) Imágenes del TEM que representan la estructura morfológica de las Au-PEI (Izquierda) y Au-PEI-PEG (Derecha). (B) Histogramas de distribución de tamaños

La espectroscopía de correlación de fotones nos proporciona información de la carga superficial de las partículas en un líquido. Las Au-PEI tiene un carga de $35 \pm 1,2$ mV mientras que cuando están cubierta por PEG, la carga se reduce a $29 \pm 0,7$ mV. Esta carga positiva es producida por el recubrimiento con PEI para lograr una mejor capacidad de transfección de siRNA (cargado negativamente). Por contraposición, las cargas catiónicas también aumentan la toxicidad al reaccionar con las membranas de las células. El PEG, por tanto, ha cumplido el objetivo el reducir la carga catiónica de las Au-PEI.

La resonancia de plasmón de superficie es una propiedad que presentan algunos materiales metálicos muy pequeños y por la cual pueden interactuar con la radiación

electromagnética para amplificar fenómenos ópticos. Esta propiedad se observa a través de espectrofotometría ultravioleta (UV). La figura 4.3 muestra un pico máximo a 525 nm para las Au-PEI que nos indican la forma y tamaño de nuestras partículas. El pico se desplaza hasta 536 nm cuando son recubiertas con PEG debido a su incremento de diámetro y al cambio en las propiedades dieléctricas del medio tras el recubrimiento.

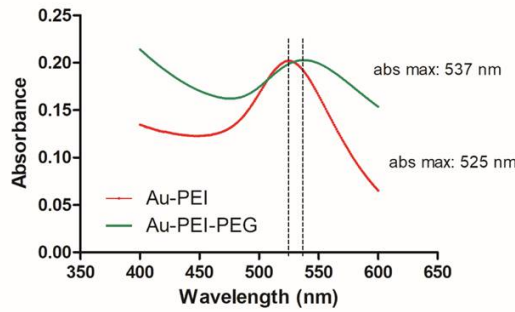


Figura 4.3: Espectro de absorción en el UV-VIS para las Au-PEI (rojo) y las Au-PEI-PEG (verde)

4.2. Conjugación de nanopartículas con siRNA

Los experimentos se han llevado a cabo con RNA de interferencia de la proteína SOD1 comercial (AM16706 Silencer™ Pre-Designed siRNA. ThermoFisher).

Con el objetivo de medir la eficiencia de la unión y establecer la capacidad máxima de unión de siRNA en la nanopartícula, se lleva a cabo un ensayo de retención en gel de agarosa. Esta técnica se basa en la deposición de las moléculas en la matriz de agarosa y en la aplicación de una corriente eléctrica entre los dos extremos del gel. Esto origina una diferencia de potencial que hace migrar los ácidos nucleicos sin conjugar (cargados negativamente) del ánodo al cátodo. En el caso de los ácidos nucleicos unidos a la nanopartícula, quedarán sin embargo retenidos en el pocillo sin migrar. Finalmente, estos ácidos nucleicos se tiñen con un intercalante de RNA (GelGreen® Nucleic Acid Gel Stain), que permite su visualización bajo radiación ultravioleta.

Se preparan diferentes ratios de siRNA-SOD1/NPs para observar cual es la concentración a la que se produce una unión electrostática más eficiente. La cantidad de RNA se mantiene constante (1 μ g) mientras que la de nanopartículas varía en los ratios peso/peso 1:1, 1:1,25, 1:2,5, 1:5, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40 y 1:50. Se lleva a un volumen final de 25 μ l. Los complejos son incubados durante 1 hora a temperatura ambiente donde se produce una unión electrostática por la diferencia de las cargas (Anexo B). Se prepara un gel de agarosa al 3 % y se aplica una corriente de 60 V de intensidad durante

2 horas. La figura 4.4 recoge los resultados de los ratios más altos de siRNA. Todas las uniones son eficientes puesto que no se observa rastro de que el siRNA no conjugado haya migrado al electrodo positivo en los pocillos en los que hay nanopartículas. Se observa que el único caso que presenta migración es el pocillo que contiene siRNA sin nanopartículas.

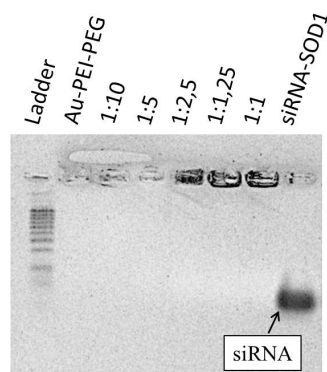


Figura 4.4: Electroforesis con gel de agarosa para diferentes ratios peso/peso de siRNA/Au-PEI-PEG. Imagen invertida para mejor visualización

4.3. Efecto de las nanopartículas sobre la línea celular de motoneurona

Los experimentos en el modelo de motoneurona de ratón se han evaluado utilizando la línea celular NSC-34 proporcionada por la Universidad de Oxford ya que es la única línea celular modelo de motoneurona. Es una línea híbrida entre células de neuroblastoma de ratón y motoneuronas de médula espinal. En la figura 4.5 se pueden observar las dos subpoblaciones con tamaños y morfologías diferentes.

El medio de cultivo ha sido *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) con concentración alta glucosa (4,5 g/l), 20% de suero fetal bovino y 1% antibióticos (penicilina/estreptomicina). Todas las placas de cultivo han sido recubiertas previamente con una disolución de colágeno A (Biochrom, catálogo número: L 7220) y lavadas con tampón fosfato salino (PBS) para eliminar el exceso. El colágeno es una matriz que mejora la supervivencia de la línea celular ayudando con la adherencia y la expansión y reduciendo la muerte celular.

4.3.1. Citotoxicidad

Se han realizado dos experimentos de citotoxicidad, uno con nanopartículas Au-PEI-PEG y otro con Au-PEI-PEG-siRNA-SOD1 con el objetivo de conocer

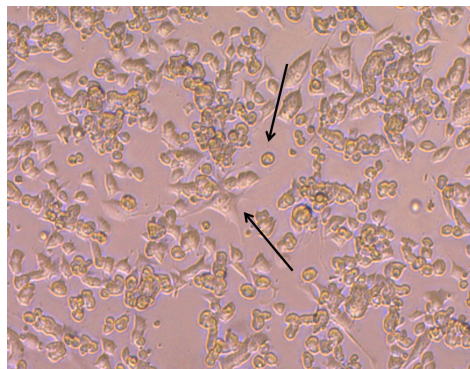


Figura 4.5: Línea celular de la NSC-34. Se observan dos tipos de células con morfologías distintas; unas más redondas y otras poligonales

la influencia de la conjugación con el siRNA-SOD1 en la toxicidad celular. Para cada experimento, se siembran 15.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos. Se evalúan diferentes concentraciones de nanopartículas para estimar la dosis subcitotóxica tolerada por la línea celular y utilizarla en posteriores experimentos. Estas concentraciones son de 0,005 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y 0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ en un volumen final de 100 μl por pocillo. Además, se establecen dos grupos de control para las Au-PEI-PEG (células sin nanopartículas y medio de cultivo sin células). Para el experimento de toxicidad de las Au-PEI-PEG-siRNA-SOD1 se mantiene la concentración de nanopartículas Au-PEI del experimento anterior pero se conjugan con siRNA a concentración 5 nM, 10 nM, 50 nM, 200 nM y 400 nM respectivamente para mantener el ratio siRNA/NPs. En este caso se establece cuatro grupos de control; sólo siRNA en concentración 10 nM y 400 nM, sólo células y sólo medio de cultivo. Se realizaron 6 réplicas experimentales de cada condición.

Antes de añadir las nanopartículas, la placa se incuba durante 24 horas a unas condiciones de 37°C y 5 % CO_2 para favorecer la adherencia celular. Una vez cambiado el medio de cultivo por el medio con las nanopartículas se incuban durante 24 horas a las mismas condiciones para que se produzca la internalización. Trascurrido el período de incubación se evalúa la viabilidad celular mediante el ensayo colorimétrico con el reactivo Resazurina (ver figura 4.6). El principio del reactivo es la reducción de resazurina en las mitocondrias de las células. Cuando la resazurina (de color azul) entra en las células vivas se reduce a resorufina que produce un compuesto de color rosa y fluorescente. La resazurina se añade a las células a una concentración de 0,1 mM y se deja incubar durante 6 horas para observar cambio de color. Este color es cuantificado mediante fluorescencia con filtro de excitación de 530 nm y emisión en 590 nm utilizando el espectrofluorímetro Synergy4 (BioTek Instruments, VT, EE.UU). La viabilidad celular se calcula respecto a la células sin tratar del grupo control mediante

la fórmula: % viabilidad = (Fluorescencia muestra/Fluorescencia control) x 100.

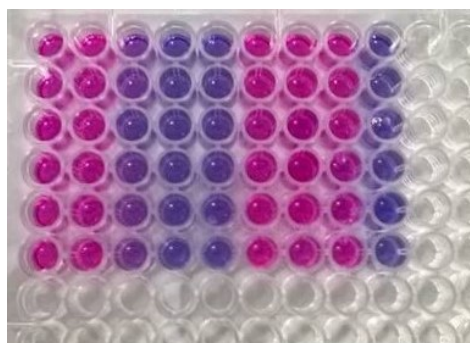


Figura 4.6: Evaluación de la toxicidad por ensayo colorimétrico de Resazurina en nanopartículas Au-PEI-PEG-siRNA-SOD1. De izquierda a derecha: Au-PEI-PEG-siRNA-SOD1 5 nM, 10 nM, 50 nM, 200 nM, 400 nM. Controles: células con siRNA 10 nM, células con siRNA-SOD1 400 nM, células sin tratar, medio de cultivo

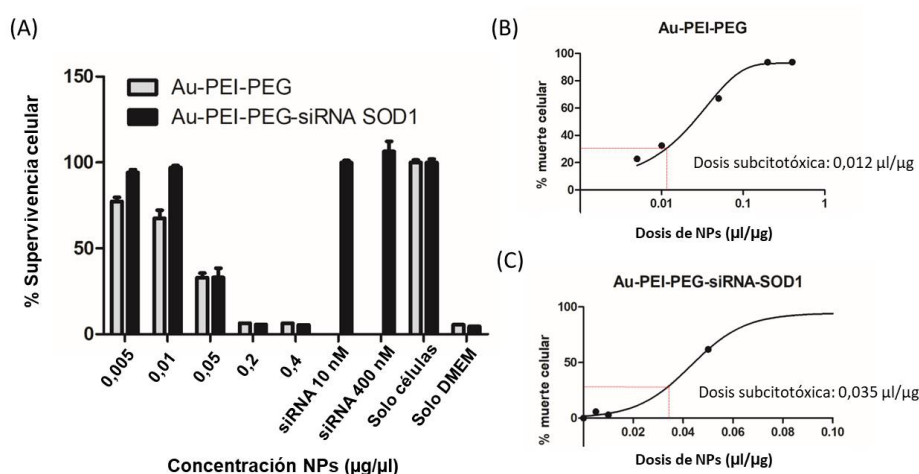


Figura 4.7: Resultados de citotoxicidad para las Au-PEI-PEG y Au-PEI-PEG-siRNA-SOD1.(A) Supervivencia celular para ambos tipos de NPs. (B) Representación de la muerte celular tras administración de diferentes dosis de Au-PEI-PEG. Dosis subcitotóxica: 0,012 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. (C) Mismo para Au-PEI-PEG-siRNA-SOD1. Dosis subcitotóxica: 0,035 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

La figura 4.7 (A) muestra los resultados de viabilidad celular obtenidos a partir del lector de placas de fluorescencia. Se produce una drástica caída de la viabilidad en más de un 50% en una concentración de 0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y la muerte celular es total para valores superiores a 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ en ambas nanopartículas (Au-PEI-PEG y Au-PEI-PEG-siRNA-SOD1). Se observa que el siRNA no es tóxico para las células y que además es protector puesto que cuando éste recubre las nanopartículas la viabilidad es superior. La dosis máxima viable (o dosis subcitotóxica) que se usará

en los posteriores experimentos viene definida como la dosis para la cual existe una supervivencia del 70 % en la población celular de acuerdo con la norma ISO 10993-5. Esta dosis se obtiene por interpolación en la gráfica que representa el porcentaje de muerte celular en función de la concentración de nanopartículas añadidas (figura 4.7 (B) y (C)) Los resultados muestran que la nanopartículas Au-PEI-PEG tienen una dosis subcitotóxica 0,012 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Por otro lado las mismas nanopartículas recubiertas con siRNA-SOD1 tiene una dosis subcitotóxica de 0,035 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, aproximadamente 3 veces superior. Por lo tanto, esta última es la dosis seleccionada para evaluar los efectos de las nanopartículas en los experimentos *in vitro* de granularidad, fases del ciclo celular e internalización en motoneuronas.

4.3.2. Regulación de la complejidad celular tras tratamiento con Au-PEI-PEG-siRNA NPs

La Citometría de Flujo (CMF) es una técnica de análisis celular por la que se obtienen diferentes parámetros de su interior. Esta técnica se basa en hacer pasar una suspensión de células alineadas de una en una por delante de un haz de láser focalizado. Las señales producidas tras el impacto son recogidas por detectores y convertidas para visualizar los parámetros deseados. Se va a utilizar Citometría de Flujo para evaluar la variación en la complejidad de la célula (o también llamada granularidad) y el ciclo celular (este último parámetro de estudiará más adelante en la sección 4.4.3.) tras el tratamiento con las nanopartículas recubiertas con siRNA-SOD1.

La complejidad interna nos proporciona información de cómo se encuentran las estructuras y organelas celulares, la membrana citoplasmática y la rugosidad de la superficie celular tras haber sido tratadas con las nanopartículas. Para ello, se siembran 100.000 células por pocillo en dos placas de seis pocillos cada una. Cuando la adherencia se ha producido (a las 12 h) se cambia el medio de cultivo de 6 de los pocillos por medio de cultivo con una concentración de 0,035 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de Au-PEI-PEG-siRNA-SOD1, dosis subcitotóxica calculada anteriormente (esquema en la figura 4.8). Se decide funcionalizar las nanopartículas Au-PEI-PEG con 50 nM de siRNA para los experimentos de citometría, lo que representa una dosis 10 veces superior a la utilizada en experimentos con otros agentes de transfección como Lipofectamina. Tras 24 horas las células son despegadas mecánicamente de las placas y suspendidas en medio de cultivo. Posteriormente se realiza un marcaje con Ioduro de Propidio, agente fluorescente intercalante del DNA, que sólo puede acceder al núcleo celular en células muertas o con permeabilidad de membrana comprometidas. De esta forma, mediante la lectura por el citómetro de la fluorescencia emitida por

cada célula se puede determinar su viabilidad y excluir de los análisis las células muertas. La figura 4.9 (A) recoge los datos de tamaño (FS) y granularidad (SS) de las

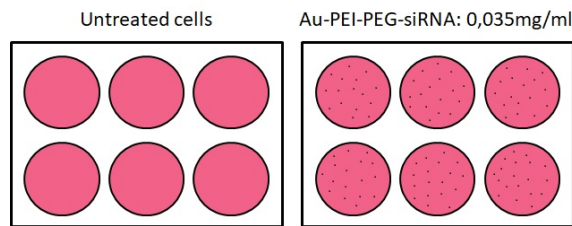


Figura 4.8: Esquema del cultivo celular para medir la granularidad

motoneuronas antes y después del tratamiento con las nanopartículas funcionalizadas con siRNA-SOD1. Como cabía esperar se observan dos subpoblaciones con diferentes valores de granularidad posiblemente debido a las diferentes características que presentan las células que componen la línea celular recogidas en la figura 4.5. Además, se obtiene un mayor número de células muertas en la población que ha sido tratada. Sin embargo el resultado que más sorprende es el cambio de granularidad de la subpoblación 1 tras tratamiento mientras que la subpoblación 2 no parece estar afectada por la internalización de las nanopartículas. Este resultado puede deberse a una mayor internalización de las Au-PEI-PEG-siRNA-SOD1 por la subpoblación 1 o a una mayor sensibilidad de esta subpoblación.

4.3.3. Regulación del ciclo celular en las motoneuronas tras tratamiento con Au-PEI-PEG-siRNA NPs

El análisis de proliferación celular se lleva a cabo a partir de la cuantificación de DNA. Esta cuantificación se va a obtener por dos técnicas; Citometría de flujo y reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Citometría de flujo Las fases del ciclo en las que se encuentran las células también se pueden determinar por CMF cuantificando la cantidad de DNA presente en el núcleo celular, que es diferente en cada fase. En la fase G0/G1 la célula está en reposo y la cantidad de DNA presente en un tipo celular depende de su dotación cromosómica. Posteriormente, en la fase S o de síntesis, la célula replica su dotación cromosómica, de forma que en la siguiente fase (fase G2/M o de mitosis), se visualizará el doble de DNA que en la fase G0/G1. Estas diferencias en la cantidad de DNA pueden observarse mediante el uso de compuestos fluorescentes como el Ioduro de Propidio que se intercalan en el DNA y pueden ser detectados por el citómetro de flujo. Así,

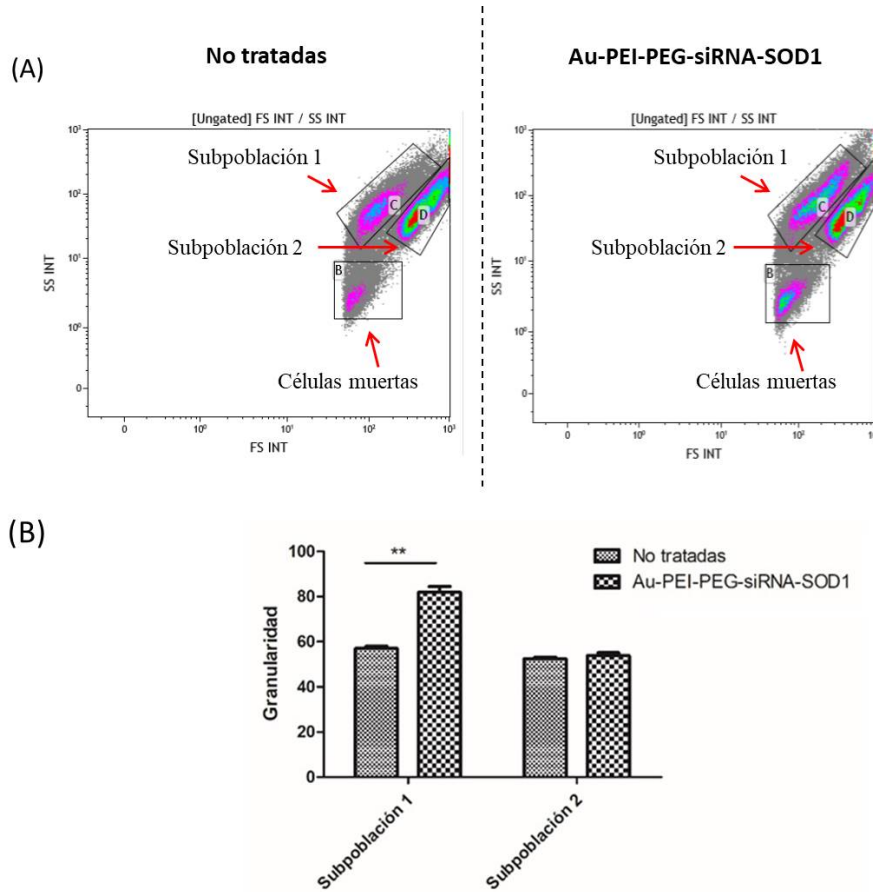


Figura 4.9: (A) Representación del tamaño frente a la granularidad. A la izquierda células no tratadas y a la derecha células tratadas con nanopartículas. (B) Cuantificación de la granularidad tras el tratamiento con nanopartículas en cada subpoblación celular

una célula en fase G2/M emitirá el doble de fluorescencia que una en G0/G1 [34]. Para aplicar esta metodología en el análisis de las fases del ciclo celular tras el tratamiento con nanopartículas Au-PEI-PEG-SOD1, se trataron 6 pocillos que contenían 100.000 células NSC-34/pocillo con 0,035 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de Au-PEI-PEG-siRNA-SOD1. Tras 24 horas las células se despegaron de la placa de cultivo por medios mecánicos (*cell scrapers*) y se fijaron y permeabilizaron mediante inmersión en etanol a 4 grados durante al menos 48 horas. Como control se utilizaron 6 pocillos que se procesaron de la misma forma, pero a los que no se trató con nanopartículas. Tras la fijación/permeabilización las células se incubaron con una solución de Ioduro de Propidio durante 15 minutos y se lavaron 2 veces con PBS 1X. Finalmente se analizaron en el equipo FACSARIA BD utilizando el canal FL3 para medir la fluorescencia emitida por el Ioduro de Propidio. Los resultados muestran:

En las células no tratadas dos picos de fluorescencia (marcados en rojo), uno

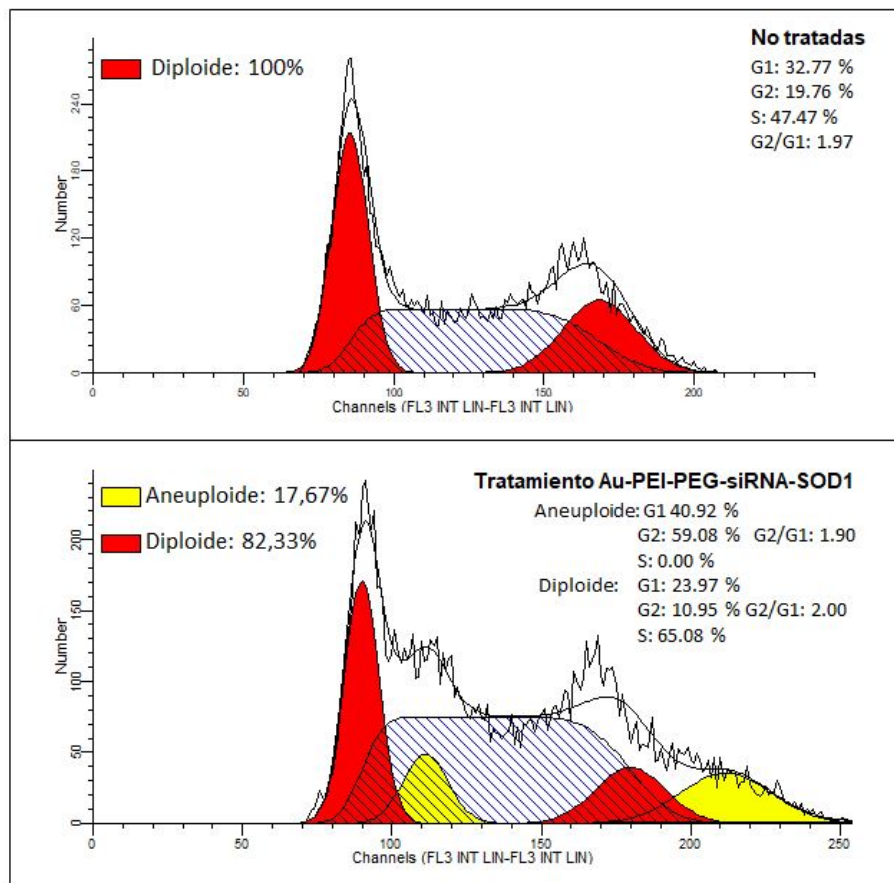


Figura 4.10: Resultados de experimento de fluorescencia mediante Citometría de Flujo

aproximadamente del doble de intensidad que el otro, corresponden a las células en fase G0/G1 y G2/M respectivamente (ver figura 4.10 superior). En estas células no observamos diferencias en el contenido de DNA entre las dos subpoblaciones de las que está compuesta nuestra línea celular.

En las células tratadas con nanopartículas Au-PEI-PEG-SOD1 sin embargo, vemos claramente como tras los picos descritos en las células control (en rojo), aparecen dos picos desplazados a la derecha de éstos (en amarillo), y por lo tanto señalando células que contienen mayor cantidad de DNA tanto en fase G0/G1 como en fase G2/M. Interpretamos estos segundos picos como una diferente respuesta al tratamiento con las nanopartículas por parte de las dos subpoblaciones (una marcada en rojo y otra en amarillo, en la gráfica inferior de la figura 4.10). Tras el tratamiento, la subpoblación marcada en amarillo aumenta su proliferación, por lo que observamos que el ratio entre la altura del pico G2/M y el pico G0/G1 es mayor que en la subpoblación señalada en rojo. Por el contrario, cuando no hay tratamiento con nanopartículas, esta subpoblación permanece mayoritariamente en fase G0/G1 por lo que su señal se ve enmascarada con

la de la subpoblación marcada en rojo.

Análisis mediante PCR en tiempo real Para la progresión del ciclo celular a través de las distintas fases mencionadas en el apartado anterior, es necesaria la acción de una serie de proteínas que contribuyen al desempaquetamiento de la cromatina, actividad de la DNA polimerasa y la replicación del DNA. Aunque estas proteínas no son específicas de una fase concreta del ciclo, los niveles de expresión de estas proteínas, y los RNA mensajeros que las codifican, nos pueden indicar variaciones en la progresión de ciclo celular. Para cuantificar estos mRNA de cada gen, se ha utilizado la técnica de PCR en tiempo real, que permite determinar el número de copias de mRNA de un gen mediante la unión de una sonda fluorescente específica de la secuencia de ese mRNA. Como indicadores de la progresión del ciclo celular hemos elegido los genes *Ccnd1* (abundantes en la fase G1) y *Cdkn1a* y *Pcna1* (expresados especialmente en la fase S) [35]. En este experimento sembramos 75.000 células por pocillo en una placa de 24 pocillos y dejamos que se adhirieran durante 24h. Posteriormente tratamos las células con Au-PEI-PEG-siRNA-SOD1 a la dosis subcitotóxica calculada anteriormente ($0,035 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) conjugándolas con distintas concentraciones de siRNA-SOD1 (ver figura 4.11). Como controles se utilizaron células no tratadas con nanopartículas y tratadas con nanopartículas sin siRNA tanto a dosis $0,012 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ (calculada como dosis subcitotóxica en nanopartículas sin conjugar con el siRNA) como a $0,035 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ (calculada como dosis subcitotóxica en nanopartículas conjugadas con el siRNA-SOD1). Se utilizaron 3 pocillos para probar cada condición. 48h tras el tratamiento las células fueron lisadas con Trizol y procesadas para obtener el mRNA y cuantificar su expresión como se indica en el Anexo C. Los resultados se han representado en la gráfica de la figura

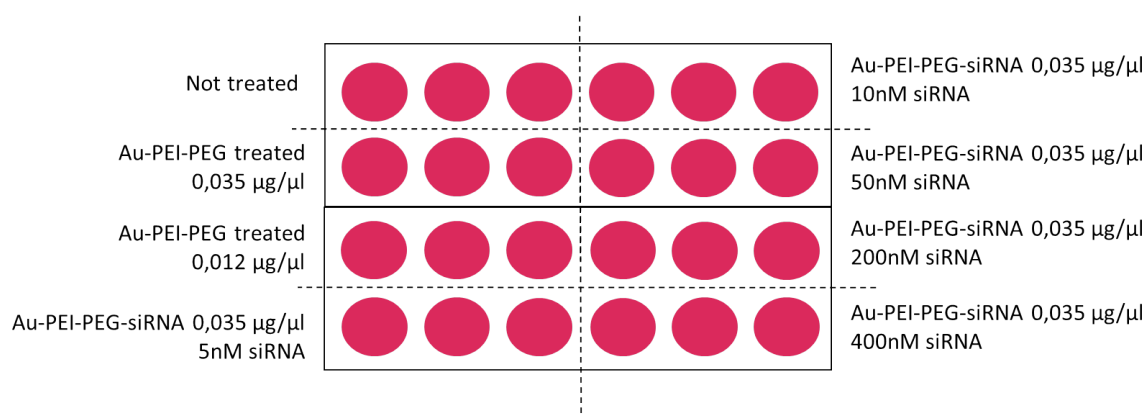


Figura 4.11: Esquema de la placa de cultivo para el experimento de PCR. Tres grupos de control y cinco concentraciones de nanopartículas Au-PEI-PEG-siRNA

4.12 y muestran los niveles de expresión de mRNA de cada gen en las condiciones

especificadas, tomando como referencia los niveles en el grupo sin tratar. Se observa que en todos los genes existe una reducción de su expresión en el grupo tratado con nanopartículas sin conjugar a ambas dosis, respecto a las no tratadas. Además, en los grupos tratados con nanopartículas conjugadas con siRNA-SOD1 esta reducción se mantiene, independientemente de la concentración a la que se haya conjugado el siRNA-SOD1 y la nanopartícula Au-PEI-PEG. Con estos resultados concluimos que a pesar de haber utilizados dosis subcitotóxicas para el tratamiento (a las que hemos observado una muerte celular menor o igual al 30 % de la población en el experimento del apartado 4.3.1), a las dosis tratadas y en las concentraciones de siRNA-SOD1 utilizadas para la conjugación con las nanopartículas, éstas modifican la expresión de los genes involucrados en la regulación de ciclo celular en este modelo celular NSC-34 de motoneurona. Por lo tanto, se ha de seguir trabajando para optimizar las condiciones de concentración de nanopartículas y siRNA-SOD1 que además de tener una toxicidad baja, modifiquen lo menos posible su ciclo celular.

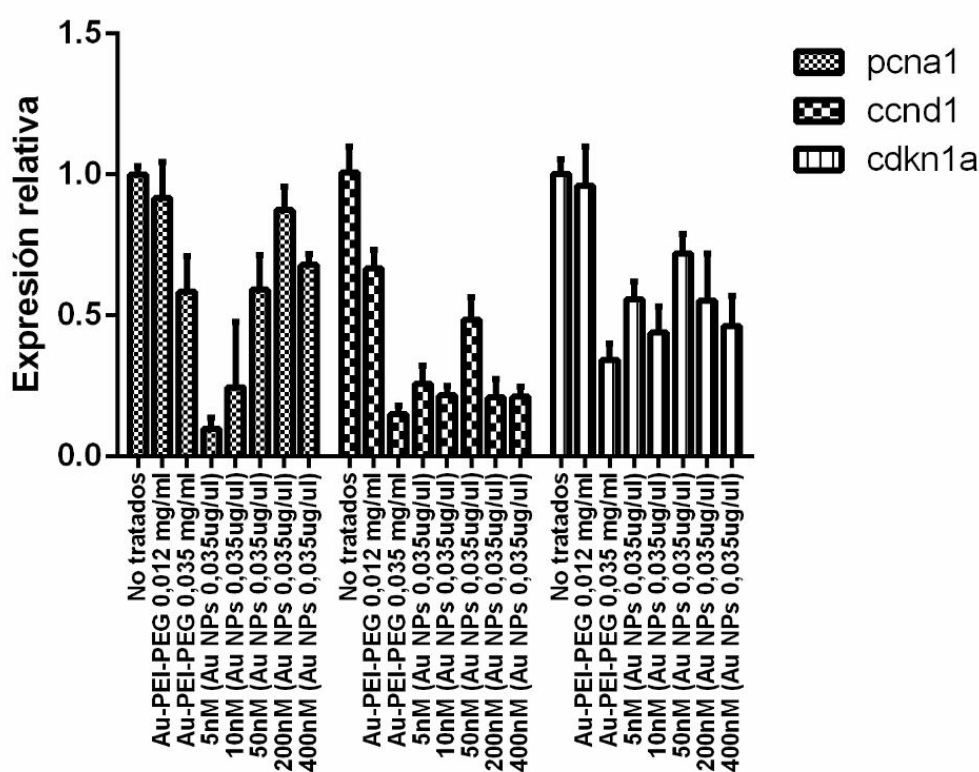


Figura 4.12: Niveles de expresión génica para los genes pcna1, ccnd1 y cdkn1a

4.3.4. Visualización de la internalización de las Au-PEI-PEG-siRNA mediante microscopía confocal

No es posible la visualización de nuestras nanopartículas por reflexión al tener un tamaño inferior a la resolución del microscopio, por lo que se decide conjugadas con un siRNA unido a un fluoróforo comercial, cianina 5 (Cy5), que emite fluorescencia en una longitud de onda en el espectro rojo lejano, con un máximo de 666nm (MISSION® siRNA Fluorescent Universal Negative Control #2, Cyanine 5 Sigma).

Para el experimento de internalización se siembra una placa de 8 pocillos con las células NSC-34 y se dejan proliferar durante 48h hasta que la confluencia es del 70 %. En este caso, debido a la poca adherencia de las células a la placa y la larga manipulación necesaria, se utilizan placas especiales ibidi (número de catalogo: 80826, Ibidi), con una superficie de cultivo pequeña y un fondo del pocillo que permite su visualización directa en un microscopio confocal. Se añade a cada pocillo la misma dosis de Au-PEI-PEG-siRNA-Cy5 a concentración subcitotóxica y cada pocillo se incuba durante 24h, 12h, 8h, 4h, 2h, 1h, 30' y 0, respectivamente. Las células se fijan con paraformaldehído al 4 % durante 20 minutos a temperatura ambiente y se permeabilizan con saponina. La tinción de citoplasma se lleva a cabo con faloidina y la de los núcleos con el Hoechst 33342. Finalmente se preparan en medio de montaje (protocolo en Anexo D).

Los resultados recogidos en la figura 4.13 muestran que a partir de las 4h las nanopartículas quedan acumuladas en la superficie de la neurona, pero es a las 24h cuando la señal intracitoplasmática es mayor. Se observan muchas nanopartículas pegadas en la membrana celular por lo que se valora aumentar el tiempo de incubación hasta 36-48 horas en futuros experimentos para favorecer su entrada en el interior celular. Por otra parte, en tiempos inferiores a 8 horas la aparición de nanopartículas desciende significativamente y en tiempos inferiores a 1 hora no se ha encontrado ninguna.

Internalización Au-PEI-PEG-siRNA

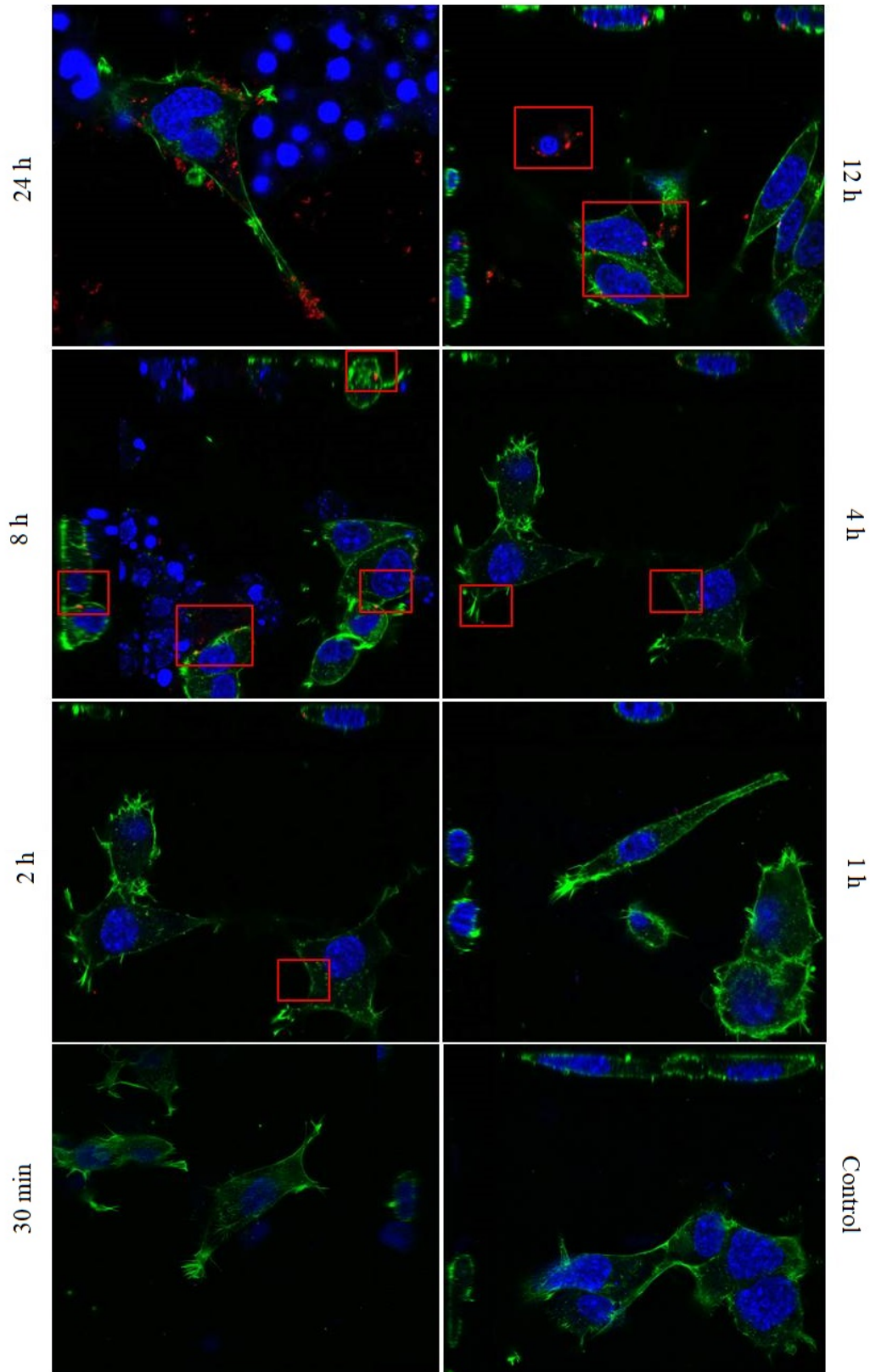


Figura 4.13: Internalización y localización de las nanopartículas Au-PEI-PEG-siRNA-Cy5 en motoneuronas mediante microscopía confocal a diferentes tiempos. En verde filamentos de actina teñidos con faloidina, en azul, el núcleo celular teñido con Hoechst 33342 y en rojo nanopartículas

Capítulo 5

Conclusiones

- Se ha conseguido la síntesis de nanopartículas muy homogéneas en forma y tamaño que cumplen con los requisitos óptimos con valores de $9,3 \pm 1,8$ nm para las Au-PEI y de $13,5 \pm 1$ nm para las Au-PEI-PEG. Además, se ha conseguido una reducción de la carga positiva tras el recubrimiento con PEG.
- Se ha comprobado la capacidad de carga y unión de las Au-PEI-PEG al mostrar una eficiencia de unión del 100 % para todas las concentraciones de siRNA evaluadas. Por tanto, se concluye que son viables como vector de carga de moléculas en terapia génica.
- Los ensayos *in vitro* en motoneuronas revelan una reducción de la toxicidad del 300 % tras la conjugación de las nanopartículas con siRNA-SOD1. Sin embargo, la influencia en el ciclo celular y la granularidad requiere de más estudios para establecer conclusiones.
- Finalmente, se ha demostrado por microscopía confocal la internalización de las nanopartículas en tiempo superiores a 8 horas produciéndose la mayor internalización a las 24 horas.
- Las nanopartículas de oro pueden tener una aplicación potencial como vectores de siRNA para reducir la transcripción de la SOD1 para el tratamiento de la Esclerosis Lateral Amiotrófica.

Capítulo 6

Futuras líneas de investigación

- A la vista de los resultados obtenidos del análisis de la influencia de las nanopartículas Au-PEI-PEG-siRNA-SOD1 sobre las motoneuronas se valora en interés de indagar más sobre los efectos de las partículas en esta población celular, las vías de internalización y los mecanismos moleculares que desencadenan los cambios en el ciclo celular observados.
- Además, se seguirá investigando para optimizar la dosis de nanopartículas y el ratio de conjugación con el siRNA de la SOD1 para que además de ser una dosis subcitotóxica, no modifique el ciclo celular de estas células, y mantenga la actividad del siRNA eliminando la transcripción del gen de la SOD1.
- Finalmente, como paso previo a su aplicación en el modelo animal de ELA SOD1-G93A se plantea la estrategia de conjugar las nanopartículas funcionalizadas con un ligando específico con tropismo por las motoneuronas.

Capítulo 7

Bibliografía

- [1] A. Arrizabalaga. Las enfermedades neurológicas causan el 19 por ciento de muertes en España. *EFE Salud*, 2018.
- [2] Franco-Dáger E. Solano-Atehortúa J. M. & Ahunca-Velásquez L. F. Zapata-Zapata, C. H. Esclerosis lateral amiotrófica: actualización. *atreia*, 29(2), 194-205, 2016.
- [3] ALS association. ¿Qué es la ELA? url<http://www.alsa.org/en-espanol/qu-es-la-ela.html>, 2019.
- [4] Fromholt S. E. O’Neal V. M. Diamond J. H. & Borchelt D. R. Ayers, J. I. Prion-like propagation of mutant SOD1 misfolding and motor neuron disease spread along neuroanatomical pathways. *Acta neuropathologica*, 131(1), 103-114, 2016.
- [5] Siddique T. Patterson D. Figlewicz D. A. Sapp P. Hentati A. ... & Rahmani Z. Rosen, D. R. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362, 59–62, 1993.
- [6] Shneider N. A. & Rowland, L. P. Amyotrophic lateral sclerosis. *New England Journal of Medicine*, 344(22), 1688-1700, 2001.
- [7] Bosco D. A. & Rotunno, M. S. An emerging role for misfolded wild-type SOD1 in sporadic ALS pathogenesis. *Frontiers in cellular neuroscience*, 7, 253, 2013.
- [8] Carr K. Reiley L. Diaz K. Guerra O. Altamirano P. F. ... & China A. Zarei, S. A comprehensive review of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Surgical neurology international*, 6, 2015.

- [9] Morfini G. Karabacak N. M. Song Y. Gros-Louis F. Pasinelli P. ... & Frosch M. P. Bosco, D. A. Wild-type and mutant sod1 share an aberrant conformation and a common pathogenic pathway in ALS. *Nature neuroscience*, 13(11), 1396, 2010.
- [10] Cova E. Davin A. Guareschi S. Abel K. Alvisi-E. ... & Cereda C. Gagliardi, S. SOD1 mRNA expression in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of disease*, 39(2), 198-203, 2010.
- [11] Dykes-Hoberg M. Culotta V. C. Price D. L.-Wong P. C. & Rothstein J. D. Watanabe, M. Histological evidence of protein aggregation in mutant SOD1 transgenic mice and in amyotrophic lateral sclerosis neural tissues. *Neurobiology of disease*, 8(6), 933-941, 2001.
- [12] Houseweart M. K. Kato S. Anderson K. L.-Anderson S. D. Ohama E. ... & Cleveland D. W. Bruijn, L. I. Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science*, 281(5384), 1851-1854, 1998.
- [13] Fernando S. M. Grad L. I. Hill A. F. Turner B. J. Yerbury J. J. & Cashman N. R. Silverman, J. M. Disease mechanisms in ALS: Misfolded SOD1 Transferred Through Exosome-Dependent and Exosome-Independent. *Cellular and molecular neurobiology*, 36(3), 377-381, 2016.
- [14] Kim H. J. & Lee, S. Prion-like mechanism in amyotrophic lateral sclerosis: are protein aggregates the key? *Experimental neurobiology*, 24(1), 1-7, 2015.
- [15] Andersen P. M. Marklund S. L. & Brännström T. Forsberg, K. Glial nuclear aggregates of superoxide dismutase-1 are regularly present in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Acta neuropathologica*, 121(5), 623-634, 2011.
- [16] Campos M. Bermudes D. B. Chuquimarca J. P. Sambache K. Niato J. F. & Guerrero P. Bucheli, M. E. Esclerosis lateral amiotrófica: revisión de evidencia médica para tratamiento. *Rev. Ecuat. Neurol*, 22, 1-3, 2013.
- [17] Mitchell J. D. & Moore D. H. Miller, R. G. Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *Cochrane database of systematic reviews*, (3), 2012.
- [18] Brooks B. R. & Silani V. Mitsumoto, H. Clinical trials in amyotrophic lateral sclerosis: why so many negative trials and how can trials be improved? *The Lancet Neurology*, 13(11), 1127-1138, 2014.

- [19] Ezzi S. A. & Julien J. P. Urushitani M. therapeutic effects of immunization with mutant superoxide dismutase in mice models of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 104, 2495–2500, 2007.
- [20] Soucy G. Larivière R. & Julien J. P. Gros-Louis, F. Intracerebroventricular infusion of monoclonal antibody or its derived Fab fragment against misfolded forms of SOD1 mutant delays mortality in a mouse model of ALS. *Journal of neurochemistry*, 113(5), 1188–1199, 2010.
- [21] Pestronk A. David W. Rothstein J. Simpson E. Appel S. H. ... & Ostrow L. W. Miller, T. M. An antisense oligonucleotide against sod1 delivered intrathecally for patients with sod1 familial amyotrophic lateral sclerosis: a phase 1, randomised, first-in-man study. *The Lancet Neurology*, 12(5), 435–442, 2013.
- [22] Kaspar B. K. Kops G. J. Yamanaka K. Christian L. J. Gage F. H. & Cleveland D. W. Miller, T. M. Virus-Delivered Small RNA Silencing Sustains Strength in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 57(5), 773–776., 2005.
- [23] López C. R. & Al-Qadi, S. Nanopartículas metálicas: oro. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 2009.
- [24] Yasemi M. Safaie-Qamsari E. Rashidiani J. Abkar M. Hassani M. ... & Kooshki H. Bagheri, S. Using gold nanoparticles in diagnosis and treatment of melanoma cancer. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 46 (sup1), 462–471, 2018.
- [25] Neuss S. Leifert-A. Fischler M. Wen F. Simon U. Schmid G. Brandau W. & Jahnke-Dechent W Pan, Y. Size-Dependent Cytotoxicity of Gold Nanoparticles. *Small*. 3 (11): 1941–194, 2007.
- [26] Dykman L. & Khlebtsov, N. Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: a review of in vitro and in vivo studies. *Chemical Society Reviews*, 40(3), 1647–1671, 2011.
- [27] K. Tomoda G. Sonavane and K. Makino. Biodistribution of colloidal gold nanoparticles after intravenous administration: Effect of particle size. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 66(2), 274–280, 2008.
- [28] Kamali M. & Baghersad M. H. Elahi, N. Recent biomedical applications of gold nanoparticles: A review. *Talanta*, 184, 537–556, 2018.

- [29] Klibanov A. M. & Thomas, M. Non-viral gene therapy: polycation-mediated DNA delivery. *Applied microbiology and biotechnology*, 62(1), 27-34, 2003.
- [30] Middaugh C. R. & Wiethoff, C. M. Barriers to nonviral gene delivery. *Journal of pharmaceutical sciences*, 92(2), 203-217, 2003.
- [31] Klibanov A. M. & Thomas, M. Conjugation to gold nanoparticles enhances polyethylenimine's transfer of plasmid DNA into mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(16), 9138-9143, 2003.
- [32] Elliott J. L. Hoffman E. K. Kowall N. W. Ferrante R. J. Siwek D. R.-... & Scott R. W. Reaume, A. G. Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nature genetics*, 13(1), 43, 1996.
- [33] Radcliffe P. A. Day D. M. Carthy J. M. Leroux M. A. Lee D. C.-... & Mitrophanous K. A. Ralph, G. S. Silencing mutant SOD1 using RNAi protects against neurodegeneration and extends survival in an ALS model. *Nature medicine*, 11(4), 429, 2005.
- [34] A. Martínez-Nistal A. Sampedro, J. R. de los Toyos. *Técnicas de fluorescencia en microscopía y citometría*. Universidad de Oviedo, 1995.
- [35] Maga G. & Spadari S. Hübscher, U. Eukaryotic DNA polymerases. *Annual review of biochemistry*, 71(1), 133-163, 2002.
- [36] Martín-Saavedra F. Yagüe C. Arruebo M.-Santamaría J. & Vilaboa N. Cebrián, V. Size-dependent transfection efficiency of PEI-coated gold nanoparticles. *Acta Biomaterialia*, 7(10), 3645-3655, 2011.
- [37] Driskell J. D. & Tripathi, K. Quantifying bound and active antibodies conjugated to gold nanoparticles: a comprehensive and robust approach to evaluate immobilization chemistry. *ACS omega*, 3(7), 8253-8259, 2018.

Lista de Figuras

1.1. Mecanismos de transmisión propuesto de los agregados tóxicos en motoneuronas que contribuyen a la patogénesis de la enfermedad [14] .	3
1.2. Tratamientos sintomáticos para la ELA según sintomatología	4
1.3. Diferentes aplicaciones de las nanopartículas de oro [24]	6
3.1. Esquema de las nanopartículas Au-PEI-PEG-siRNA-SOD1. El núcleo es de oro y está recubierta por una capa de PEG. En la superficie se conjugan electrostáticamente siRNA-SOD1	12
4.1. Nanopartículas Au-PEI tras diálisis.	13
4.2. Caracterización del tamaño de las nanopartículas Au-PEI y Au-PEI-PEG. (A) Imágenes del TEM que representan la estructura morfológica de las Au-PEI (Izquierda) y Au-PEI-PEG (Derecha). (B) Histogramas de distribución de tamaños	14
4.3. Espectro de absorción en el UV-VIS para las Au-PEI (rojo) y las Au-PEI-PEG (verde)	15
4.4. Electroforesis con gel de agarosa para diferentes ratios peso/peso de siRNA/Au-PEI-PEG. Imagen invertida para mejor visualización	16
4.5. Línea celular de la NSC-34. Se observan dos tipos de células con morfologías distintas; unas más redondas y otras poligonales	17
4.6. Evaluación de la toxicidad por ensayo colorimétrico de Resazurina en nanopartículas Au-PEI-PEG-siRNA-SOD1. De izquierda a derecha: Au-PEI-PEG-siRNA-SOD1 5 nM, 10 nM, 50 nM, 200 nM, 400 nM. Controles: células con siRNA 10 nM, células con siRNA-SOD1 400 nM, células sin tratar, medio de cultivo	18

4.7. Resultados de citotoxicidad para las Au-PEI-PEG y Au-PEI-PEG-siRNA-SOD1.(A) Supervivencia celular para ambos tipos de NPs. (B) Representación de la muerte celular tras administración de diferentes dosis de Au-PEI-PEG. Dosis subcitotóxica: 0,012 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. (C) Mismo para Au-PEI-PEG-siRNA-SOD1. Dosis subcitotóxica: 0,035 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	18
4.8. Esquema del cultivo celular para medir la granularidad	20
4.9. (A) Representación del tamaño frente a la granularidad. A la izquierda células no tratadas y a la derecha células tratadas con nanopartículas. (B) Cuantificación de la granularidad tras el tratamiento con nanopartículas en cada subpoblación celular	21
4.10. Resultados de experimento de fluorescencia mediante Citometría de Flujo	22
4.11. Esquema de la placa de cultivo para el experimento de PCR. Tres grupos de control y cinco concentraciones de nanopartículas Au-PEI-PEG-siRNA	23
4.12. Niveles de expresión génica para los genes pcna1, ccnd1 y cdkn1a . . .	24
4.13. Internalización y localización de las nanopartículas Au-PEI-PEG-siRNA-Cy5 en motoneuronas mediante microscopía confocal a diferentes tiempos. En verde filamentos de actina teñidos con faloidina, en azul, el núcleo celular teñido con Hoechst 33342 y en rojo nanopartículas	26

Anexos

Anexos A

Protocolos de síntesis de nanopartículas

A.1. Nanopartículas Au-PEI

REACTIVOS

- HAuCl_4 99 % pureza (Ref:520918-1G, Sigma-Aldrich)
- Polietilenimina (PEI) (Ref:408727, Sigma-Aldrich)

PROCEDIMIENTO

1. Se preparan 95 ml de HAuCl_4 50mg/l: Mezclar 475 μl de HAuCl_4 de concentración 10 mg/ml (previamente preparado) con 94,525 ml de agua milli-Q.(*)

Para la preparación de la disolución de HAuCl_4 10 mg/ml se pesan 10 mg en la balanza de precisión y se diluyen en 1 ml de agua milli-Q.

2. Se añaden 5 ml de PEI 0,5 mM. Hecho a partir de disolución 5 mM. Para preparar la disolución de 5mM se pesa 125 mg de PEI y se disuelven en 1 ml de agua milli-Q.
3. Se pone a calentar en una placa hasta alcanzar ebullición con agitación vigorosa (600-800 rpm).
4. Se dejar reacción en ebullición durante 15 minutos o hasta observar cambio de color.
5. Una vez se haya enfriado, se cuantifica la absorbancia en el UV en para confirmar que se asemeja al tamaño que buscamos, el pico debe aparecer sobre los 522 nm.

6. Lavado por diálisis durante 48 horas con filtros 50 kDalton para eliminar los restos que no han reaccionado. Se cambia el agua dos veces al día (agua destilada) y se pone en agitación.

*Los residuos se tiran en la garrafa de disoluciones acuosas con metales.

(*) Todas las reacciones y el almacenamiento de las nanopartículas se lleva a cabo en recipientes de cristal debido a la fácil adherencia de estas partículas en el plástico.

A.2. Recubrimiento con PEG

REACTIVOS

- Nanopartículas Au-PEI
- (O-(3-Carboxipropil)-O'-[2-(3-mercaptopropionilamino)etil]-polietilenglicol) (Ref: 712515 Sigma-Aldrich). Sinónimo: α -Mercapto- ω -carboxy-PEG

PROCEDIMIENTO

1. Se pone bajo agitación (800 rpm) 2 ml de nanopartículas Au-PEI a concentración de 2 mg/ml.
2. Se añade gota a gota 2 ml de PEG a concentración 2 mg/ml.
Para ello se pesa en la báscula de precisión 4 mg de PEG y se diluyen en 2 ml agua milli-Q.
3. Se deja reaccionar durante 4 horas a temperatura ambiente.
4. Se quita el exceso de PEG mediante diálisis con filtros de 14 kDalton. Estos filtros han de ser previamente hidratados sumergiéndolos en agua a 60°C durante 30 minutos.

Anexos B

Protocolo de funcionalización de nanopartículas con siRNA

REACTIVOS

- siRNA-SOD1 (Ref:AM16706 SilencerTM Pre-Designed siRNA. ThermoFisher)
- Agua libre de RNA/DNAsas
- Nanopartículas Au-PEI-PEG

PROCEDIMIENTO

1. Se diluye el stock de siRNA a concentración $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$.
El stock es de 5 nmoles por lo que se diluye en $66,5 \mu\text{l}$.
2. Se mezcla el siRNA-SOD1 y las Au-PEI-PEG al ratio de concentración deseada.
3. Se dejan incubando durante 1 hora a temperatura ambiente.

Anexos C

Protocolo de PCR cuantitativa

REACTIVOS

- Nanopartículas Au-PEI-PEG
- SOD1-siRNA
- Kit comercial Direct-zol™ RNA MiniPrep
- Kit comercial Quantabio CDNA SuperMix
- Agua libre de DNAsas
- Fast Universal PCR Master Mix (2x) Taqman™
- Sondas Taqman™ (B2M, pcna1, ccnd1 y cdkn1a)

PROCEDIMIENTO

1. Siembra de células en placas de 24 pocillos: Se siembran 75.000 células por pocillo y se dejan incubar hasta que se adhieren al fondo del pocillo.
2. Conjugación de nanopartículas Au-PEI-PEG-SOD1: Se conjugan las nanopartículas a una concentración de 0,035 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ con siRNA a diferentes concentraciones (5 nM, 10 nM, 50 nM, 200 nM y 400 nM). Además se preparan 3 grupos de control: no tratadas, solo nanopartículas a concentración 0,012 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y 0,035 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ como indica la figura 4.11.
3. Se añaden las nanopartículas a las células en un volumen final de 500 μl por pocillo y se dejan incubar durante 48 horas.
4. Extracción del RNA: se extrae el RNA con el kit comercial Direct-zol™ RNA MiniPrep.

5. Retrotranscripción del RNA extraído a DNA: se retrotranscriben 100 ng de cada muestra de RNA a cDNA con el kit comercial Quantabio CDNA SuperMix.
6. El cDNA se diluye en proporción 1:2 con agua libre de DNAsas para hacer la PCR cuantitativa a tiempo real. Se añade 2,5 μ l de Master Mix, 0,25 μ l de Sonda del gen evaluado, 1,25 μ l de agua a 1 μ l de cada muestra de cDNA diluido. Cada una de las muestras se hace por triplicado. La amplificación se lleva a cabo con el instrumento Applied Biosystems.

Anexos D

Protocolos de permeabilización y tinción para microscopía confocal

REACTIVOS

- PBS 1x
- PBS BSA 1 %: Se diluyen 0,5 gramos de Bovine Serum Albumin (BSA) en 50 ml de PBS 1x
- PBS BSA saponina 0,1 %: Se añaden 0,05 gramos de saponina a la disolución PBS BSA 1 %
- Faloidina 1/200: Se añaden 5 μ l de faloidina a 1 ml de la disolución PBS BSA saponina 0,1 %
- Hoechst 33342 (Bisbenzimidazole H 33342 trihydrochloride)
- Medio de montaje

PROCEDIMIENTO

1. Se prepara la cámara húmeda, poniendo papel de filtro mojado en un tupper.
2. Se añade 100 μ l de la disolución de faloidina en cada pocillo de la placa.
3. Se deja incubando 1 hora en la oscuridad.
4. Se retira la faloidina.
5. Preparación del medio de montaje con Hoechst 33342: 10 μ l de Hoechst con 16 gotas de medio de montaje.
6. Finalmente, se añaden dos gotas del medio de montaje con tinción (apartado 5) por cada pocillo.